

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

AG

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication
number:

1020040053651 A

(43)Date of publication of application:
17.12.2002

(21)Application number: 1020020080831

(22)Date of filing: 24.06.2004

(71)Applicant:

POSTECH FOUNDATION

(72)Inventor:

CHOI, YO HAN
LEE, SEUNG SEOP
SON, SANG UK

(51)Int. Cl.

C12M 1 /34

(54) CELL CULTURE DISH FORMED WITH LATTICE

(57) Abstract:

PURPOSE: Cell culture dish formed with lattice is provided, thereby directly numbering cultured cells without separating the cells from the culture dish through a microscope. CONSTITUTION: The cell culture dish formed with lattice has a cell growth layer on the lattice. The method for preparing the cell culture dish formed with lattice comprises the steps of: patterning the lattice having a constant area on the metal membrane of a substrate using photolithography; and pressurizing the lattice patterned metal membrane on a substrate of the cell culture dish to copy the metal membrane lattice pattern to the substrate of the cell culture dish, wherein a compound may be coated on the lattice formed substrate of the cell culture dish to form a cell growth layer; the compound is polylysine, polyethylene, polypropylene, copolymer thereof or glass; and plasma surface modification under vacuum for proliferation of cells may be further induced.

copyright KIPO 2004

Legal Status

Date of request for an examination (20021217)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20050211)

Patent registration number (1004798480000)

Date of registration (20050322)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C12M 1/34

(11) 공개번호 10-2004-0053651
(43) 공개일자 2004년06월24일

(21) 출원번호 10-2002-0080831
(22) 출원일자 2002년12월17일

(71) 출원인 학교법인 포항공과대학교
경북 포항시 남구 효자동 산31번지

(72) 발명자 이승섭
경상북도포항시남구지곡동756교수아파트6동303호

최요한
경상북도포항시남구지곡동포항공대기숙사10동402호

손상옥
경상북도포항시남구지곡동포항공대대학원아파트1동103호

(74) 대리인 이영필
이해영

심사청구 : 있음

(54) 격자가 형성된 세포 배양용 용기

요약

본 발명은 세포 배양용 용기에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 기판 상에 일정한 면적을 갖는 격자 패턴을 포함하는 세포 배양용 용기에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 세포를 배양 용기로부터 분리하지 않고, 세포 배양용 용기로부터 직접적으로 계수할 수 있다.

대표도

도 3a

색인어

격자, 세포 배양용 용기, 계수, 포토리소그래피

명세서

도면의 간단한 설명

도1은 포토리소그래피를 이용하여 격자를 세포 배양용 용기에 직접 형성시키는 과정의 일예를 모식적으로 나타내는 도면이다.

도2는 금속 격자를 주형으로 하여 격자를 세포 배양용 용기에 형성시키는 과정의 일예를 모식적으로 나타내는 도면이다.

도3은 도1에 나타난 과정에 따라 제조된 본 발명의 세포 배양용 용기에서 배양된 세포를 나타내는 사진으로, 도3a는 SupT1 세포이고, 도3b는 Hela 세포이다.

도4는 도2에 나타난 과정에 따라 제조된 본 발명의 세포 배양용 용기에서 배양된 세포를 나타내는 사진으로, 도4a 내지 도4c는 각각 70, 160 및 320 배율에서 관찰한 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 격자가 형성된 세포 배양용 용기 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

종래의 세포 배양용 용기는 세포가 자랄 수 있는 물리화학적 처리만 이루어진 것이었다. 따라서, 종래의 세포 배양용 용기에서 자란 세포의 수를 계수하기 위 하여는, 세포를 배양용기로부터 분리하고, 이를 세포 계수를 위한 도구에 옮겨야 했다. 세포 계수는 쿨터 카운터나 FACS와 같은 자동화 기기를 사용하거나 헤마토사이토미터와 같은 도구를 사용하여 현미경하에서 직접 계수하는 방법이 사용되었다. 그러나, 이러한 세포 계수 방법들은 세포를 세포 배양 용기로부터 분리하여야 하므로 불편하고, 별도의 세포 계수기를 준비해야 한다는 문제점이 있었다. 또한, 세포를 배양 용기로부터 분리하는 과정에 의하여 외부 미생물에 의한 오염과 측정되는 세포수에 오차가 발생할 수 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은, 세포를 세포 배양용 용기로부터 분리하지 않고도 배양 용기로부터 직접적으로 세포를 계수할 수 있는 세포 배양 용기를 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 또한, 용기로부터 직접적으로 세포를 계수할 수 있는 상기 세포 배양 용기를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 기판 상에 일정한 면적을 갖는 격자 패턴을 포함하는 세포 배양용 용기를 제공한다.

상기 기판은 상기 격자 패턴의 기저가 되는 물질로서 상기 격자 패턴의 토대가 된다. 상기 기판은 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 이들의 공중합체 또는 유리가 될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 바람직하기로는, 상기 기판은 투명한 것이다. 상기 격자는 균일한 면적을 가지며, 여러가지 형상 예를 들면, 방사상 또는 원형 또는 바둑판 무늬와 같은 형상을 가진다. 상기 격자는 통상 의 반도체 제조 공정에서 사용되는 패턴 형성 공정, 예를 들면 포토리소그래피와 같은 방법 및 열 부조세공에 의하여 형성되는 패턴의 형태로 제작될 수 있다. 상기 격자는 현미경하에서 상기 격자 내에 존재하는 세포를 계수하고, 얻어진 세포수에 배양 용기 대비 상기 단위 격자의 면적의 비를 곱하여 최종적으로 배양 용기내의 전체 세포 수를 계수하는 데 사용된다. 상기 단위 격자의 면적은 일정한 면적을 갖는 것이면 특별한 제한은 없으나, 바람직하기로는 통상적으로 사용되는 1 mm^2 인 것이다. 또한, 상기 기판은 세포의 부착이나 성장을 돕기 위하여 표면처리된 것일 수 있다. 예를 들면, 진공상에서의 기체 플라즈마 처리에 의하여 표면 처리된 것일 수 있다.

본 발명의 상기 세포 배양용 용기에는 상기 격자 패턴 상에 형성된 성장층을 더 포함할 수 있다. 상기 성장층은 세포가 고착 또는 부유하여 자랄 수 있도록하여 성장을 지지하여 주는 층이다. 상기 성장층은 세포에 유독하지 않아 세포 성장을 지지할 수 있는 물질로 이루어진, 아주 얇은 박막의 형태이다. 상기 성장층은 예를 들면, 폴리라이신이다. 또한, 상기 성장층은 세포가 고착하여 자랄 수 있는 물질 뿐만 아니라, 부유하여 자라는 세포의 성장을 지지할 수 있는 물질도 포함된다. 바람직하기로는, 상기 성장층은 투명한 것이다.

본 발명은 배양용기 기판 상에 포토리소그래피(photolithography)를 이용하여 일정한 면적을 갖는 격자를 패터닝하는 단계를 포함하는 상기 세포 배양용 용기를 제조하는 방법을 제공한다.

상기 본 발명의 방법에는 또한, 상기 격자가 패터닝된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하여 성장층을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기 배양용기 기판은 그 위에 형성되는 격자 패턴 또는 성장층을 지지할 수 있고, 상기 패터닝은 양각 또는 음각의 형태를 가질 수 있다. 또한, 상기 격자는 포토레지스트 물질 또는 기판을 구성하는 물질에 의하여 형성되는 것을 포함한다. 상기 세포가 자랄 수 있는 화합물이란, 독성이 없어 세포가 부착 또는 부유하여 자랄 수 있는 화합물을 의미한다. 또한, 상기 기판은 세포의 부착이나 성장을 돕기 위하여 표면처리된 것일 수 있다. 또한, 상기 패터닝 후의 기판을 표면처리할 수도 있다. 상기 표면처리는 예를 들면, 진공상에서의 기체 플라즈마 처리에 의하여 표면 처리된 것일 수 있다.

본 발명은 또한, 배양용기 기판 상에 포토레지스트를 도포하는 단계;

상기 포토레지스트가 도포된 배양용기 기판상에 일정한 면적을 갖는 격자가 그려진 마스크를 씌우는 단계; 및

노광하고 현상하여 상기 격자의 포토레지스트 패턴을 형성하는 단계를 포함하는 방법일 수 있다.

상기 방법은 또한, 상기 격자의 포토레지스트 패턴 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하여 성장층을 형성하는 단계를 포함하는 방법일 수 있다.

여기서, 상기 배양용기 기판은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 이들의 공중합체 또는 유리이고, 투명한 형태인 것이 바람직하다. 또한, 상기 세포가 자랄 수 있는 화합물은 양전하를 띄는 폴리라이신 (polylysine) 계통의 물질이 바람직하나, 여기에 한정되는 것은 아니고 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질이 사용될 수 있다. 또한, 상기 패터닝된 기판은 세포의 부착이나 성장을 돕기 위하여 표면처리할 수 있다. 상기 표면처리는 예를 들면, 진공상에서의 기체 플라즈마 처리에 의하여 표면 처리하는 것일 수 있다.

본 발명에서 상기 포토리소그래피는 통상의 반도체 제조 공정에서 사용되는 패턴 형성 공정의 한 방법을 의미한다. 통상적으로 포토리소그래피는 기판의 세척, 포토레지스트의 도포, 마스크의 부착, 현상 및/또는 식각 과정을 포함한다. 또한, 상기 포토레지스트는 광감재를 말한다.

이상의 포토리소그래피를 이용하여 배양용기 기판 상에 격자를 형성시키는 과정의 일예를 도1을 참조하여 설명하면 다음과 같다.

먼저, 배양용기 기판(2) 상에 포토레지스트(3)를 코팅한다. 포토레지스트가 코팅된 배양용기 기판 상에 격자가 그려진 마스크를 씌우고, 노광한다. 노광한 후 노광된 부분을 현상하면, 포토레지스트에 격자 패턴(4)이 형성된다. 여기에, 세포가 자랄 수 있는 화합물을 코팅하여 성장층(6)을 형성함으로써 본 발명의 격자가 그려진 배양용기를 제조한다.

본 발명은 또한, 기판 상의 금속 막에 포토리소그래피를 이용하여 일정한 면적을 갖는 격자를 패터닝하는 단계; 및 상기 격자가 패터닝된 금속 막을 배양용기 기판에 압착하여 금속 막 격자 패턴을 전사하는 단계를 포함하는 상기 세포 배양용 용기를 제조하는 방법을 제공한다.

상기 방법은, 상기 격자 패턴이 전사된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하여 성장층을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기 방법은 기판 상에 금속 막을 침적시키는 단계;

상기 금속 막이 침적된 기판 상에 포토레지스트를 도포하는 단계;

상기 포토레지스트가 도포된 기판상에 일정한 면적을 갖는 격자가 그려진 마스크를 씌우고 노광하고 현상하는 단계;

상기 격자 패턴에 따라 상기 금속 막을 식각하는 단계;

얻어진 금속 막의 격자 패턴을 갖는 주형용 기판을 주형으로 하여 배양용기 기판에 상기 격자 패턴을 전사하는 단계; 및

상기 격자 패턴을 갖는 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하는 단계를 포함하는 방법일 수 있다. 또한, 상기 격자 패턴을 갖는 배양용기 기판 상에 세포가 부착될 수 있도록 표면처리할 수 있다. 상기 표면처리는 예를 들면, 진공상의 기체 플라즈마를 처리하는 것일 수 있다.

여기서, 상기 주형용 기판은 유리, 실리콘 또는 금속일 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 배양용기 기판은 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 이들의 공중합체 또는 유리인 것이 바람직하다. 상기 금속은 특별한 제한은 없으나, 바람직하기로는 구리, 백금, 강철, 금 또는 알루미늄이다. 또한, 상기 세포가 자랄 수 있는 화합물은 독성이 없어 세포가 부착 또는 부유하여 자랄 수 있는 화합물을 의미한다. 상기 화합물에는 예를 들면, 폴리라이신이 포함된다. 상기 배양용기 기판은 투명한 것이어서, 세포를 현미경하에서 직접 계수할 수 있는 것이 바람직하다.

이상과 같은 금속 격자를 주형으로 하여 격자를 세포 배양용기 기판에 형성시키는 과정의 일예를 도2를 참조하여 설명하면 다음과 같다.

먼저, 금속 격자용 기판(8) 상에 금속(10)을 침적시킨다. 금속이 침적된 상기 기판(8) 상에 격자가 그려진 마스크를 씌우고, 노광한 후 현상한다. 현상이 끝난 후, 식각하여 금속의 격자(12)를 형성시킨다. 얻어진 금속 격자(12)와 배양용기 기판(2)을 일정한 온도로 가열하고, 상기 금속 격자(12)를 배양용기 기판(2)에 압착하여 격자의 패턴을 배양용기 기판(2)으로 전사한다. 상기 금속 격자(12)를 제거하고, 세포가 자랄 수 있는 화합물을 코팅하여 성장층(6)을 형성함으로써 본 발명의 격자가 그려진 배양용기를 제조한다.

한편, 본 발명에서 기재한 성장층을 형성하는 과정이나 플라즈마로써 기판을 표면처리하는 과정은 기판에 금속 격자에 의한 패턴이 형성되기 이전에도 이루어질 수 있다.

이하 본 발명의 세포 배양용 용기의 제조 과정을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1: 포토리소그래피 법을 통하여 격자를 배양용기 기판에 직접 형성하는 과정을 통한 배양용 용기의 제조

먼저, 세포가 자라는 세포 배양 용기(폴리스티렌 재질, Falcon 사)의 면을 탈이온수로 세척하고, 질소로 건조시켰다. 여기에 감광재 접착을 위하여 프로모터(HMDS; hexamethyldisilazane)를 500 rpm으로 스핀 코팅한 다음, 감광재(AZ5314)(Clariant Industries Ltd. Korea 사의 제품)를 5,000 rpm으로 1.3 μ m 두께로 스핀 코팅하였다.

상기 감광재가 코팅된 배양용 용기 상에 격자(50 μ m x 50 μ m)의 배열이 새겨진 마스크를 씌우고, UV(310-405 nm)를 노광한 다음, 현상액(AZ300MIF)(Clariant Industries Ltd. Korea 사의 제품)에 1분 동안 침액시켜 UV에 노출된 감광재 부분을 식각하였다.

상기와 같이 격자 패턴이 형성된 상기 배양용 용기 상에 세포가 붙어 자랄 수 있도록 하기 위하여, 폴리라이신(poly-L-lysine)(Sigma 사 제품) 용액을 상온에서 10분 동안 처리하고, PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척하였다.

위와 같이 얻어진 격자가 형성된 세포 배양용 용기를 이용하여 사람 T 세포의 일종인 SupT1, 또는 사람 자궁경부암 세포인 Hela 세포를 배양하고, 세포계수를 하였다. 그 결과, 세포가 배양된 용기 상에서 직접 현미경을 통하여 세포를 계수 할 수 있음을 알 수 있었다.

본 실시예에서는 얻어진 배양용 용기의 격자 상에서 세포가 자라는 형태를 도3a 및 도3b에 나타내었다. 도3a는 Sup T1 세포(250 배율)가 자라는 모양을 나타낸 것이고, 도3b는 Hela 세포(270 배율)가 자라는 모양이다.

실시예 2: 포토리소그래피를 이용하여 금속 막 격자를 만들고, 이를 주형으로 하여 세포 배양용기 기판에 격자를 형성시키는 과정을 통한 격자를 갖는 배양 용기의 제조

유리 또는 실리콘으로 된 기판 상에 알루미늄 또는 금으로 된 금속을 1 μ m 두께로 침적시켰다. 감광재를 접착시키기 위하여 프로모터(HMDS; hexamethyldisilazane)를 5,000 rpm으로 스핀 코팅한 다음, 감광재(AZ5314)(Clariant Industries Ltd. Korea 사의 제품)를 5,000rpm으로 1.3 μ m 두께로 스핀 코팅하였다.

상기 감광재가 코팅된 배양용 용기 상에 격자(50 μ m x 50 μ m)가 새겨진 마스크를 씌우고, UV(310-405 nm)를 노광한 다음, 현상액(AZ300MIF)(Clariant Industries Ltd. Korea 사의 제품)에 1분 동안 침액시켜 UV에 노출된 감광재 부분을 식각하였다.

다음으로, 상기 격자 패턴이 형성된 기판을 금속 시각액 속에 침액시켜, 금속 격자를 형성시킨 다음, 남은 감광재를 아세톤 및 메탄올에 각각 1분 동안 침액시켜 제거하였다.

상기와 같이 제작된 금속 격자를 갖는 주형용 기판을 배양용 용기에 격자를 형성시키기 위한 주형으로 사용하였다. 상기 금속 격자를 갖는 기판을 120℃까지 가열한 다음, 세포가 자라는 배양용 용기 면에 눌러서 격자를 형성시켰다.

위와 같이 얻어진 격자가 형성된 세포 배양용 용기를 이용하여 사람 T 세포의 일종인 SupT1, 또는 사람 자궁경부암 세포인 Hela 세포를 배양하고, 세포계수를 하였다. 그 결과, 세포가 배양된 용기 상에서 직접 현미경을 통하여 세포를 계수 할 수 있음을 알 수 있었다.

본 실시예에서는 얻어진 배양용 용기의 격자 상에서 세포가 자라는 형태를 도4a 내지 도4c에 나타내었다. 도4a 내지 도4c는 Hela 세포가 자라는 모양으로, 각각 70 배율, 160 배율 및 320 배율에서 관찰한 사진이다.

발명의 효과

본 발명의 격자를 갖는 세포 배양용 용기에 의하면, 세포가 배양된 용기로부터 현미경을 통하여 직접적으로 세포를 계수할 수 있다.

본 발명의 세포 배양용 용기의 제조방법에 의하면, 격자를 갖는 세포 배양용 용기를 제조할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

기판 상에 일정한 면적을 갖는 격자 패턴을 포함하는 세포 배양용 용기.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 격자 패턴 상에 형성된 성장층을 더 포함하는 세포 배양용 용기.

청구항 3.

배양용기 기판 상에 포토리소그래피(photolithography)를 이용하여 일정한 면적을 갖는 격자를 패터닝하는 단계를 포함하는 제1항의 세포 배양용 용기를 제조하는 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 격자가 패터닝된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하여 성장층을 형성하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 화합물은 폴리라이신, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 이들의 공중합체 또는 유리인 방법

청구항 6.

제3항에 있어서, 상기 격자가 패터닝된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있도록 진공상의 기체 플라즈마를 이용하여 표면 변이를 유발하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 7.

기판 상의 금속 막에 포토리소그래피를 이용하여 일정한 면적을 갖는 격자를 패터닝하는 단계; 및

상기 격자가 패터닝된 금속 막을 배양용기 기판에 압착하여 금속 막 격자 패턴을 전사하는 단계를 포함하는 제1항의 세포 배양용 용기를 제조하는 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 격자 패턴이 전사된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있는 화합물을 도포하여 성장층을 형성하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 화합물은 폴리라이신, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 이들의 공중합체 또는 유리인 방법.

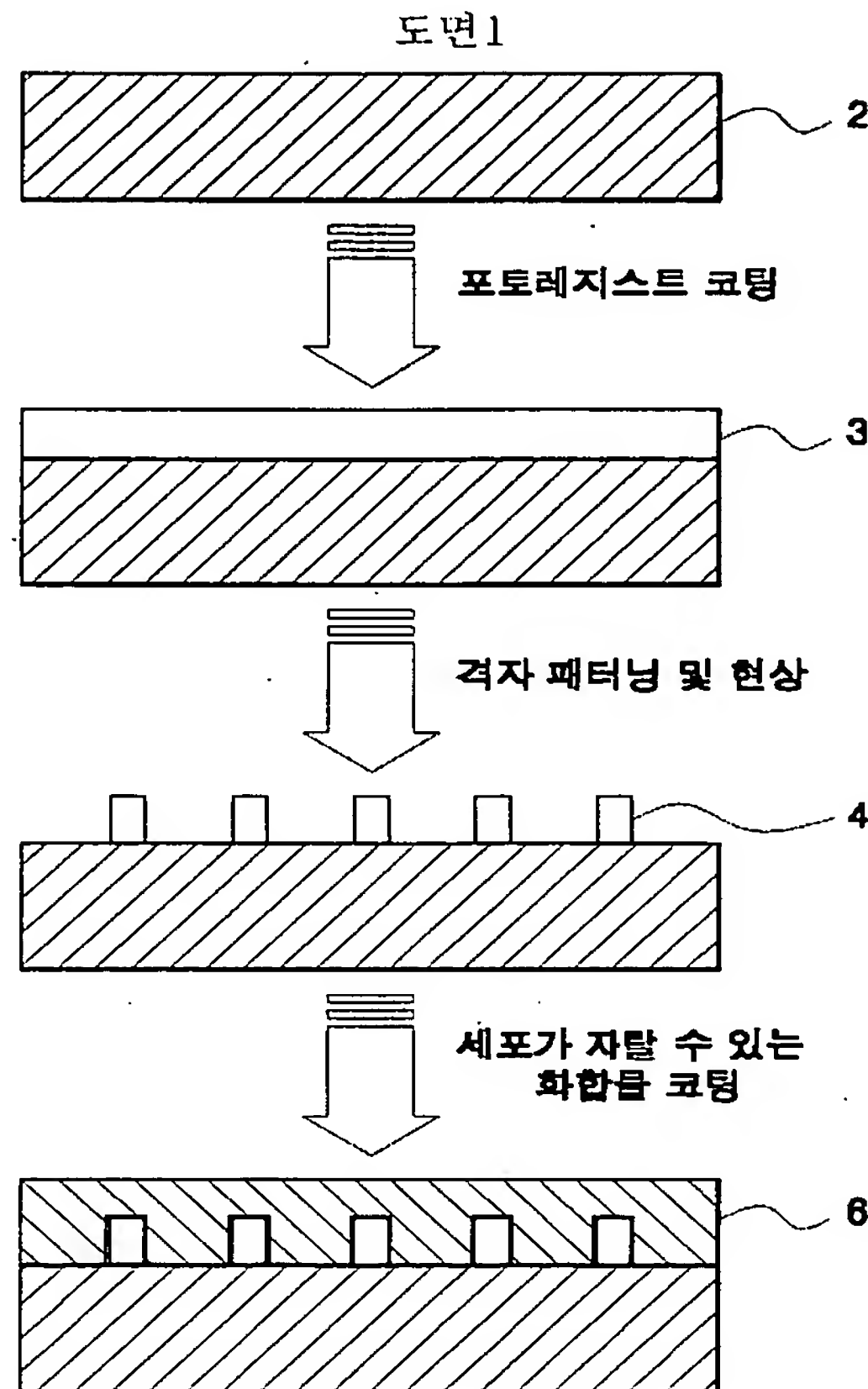
청구항 10.

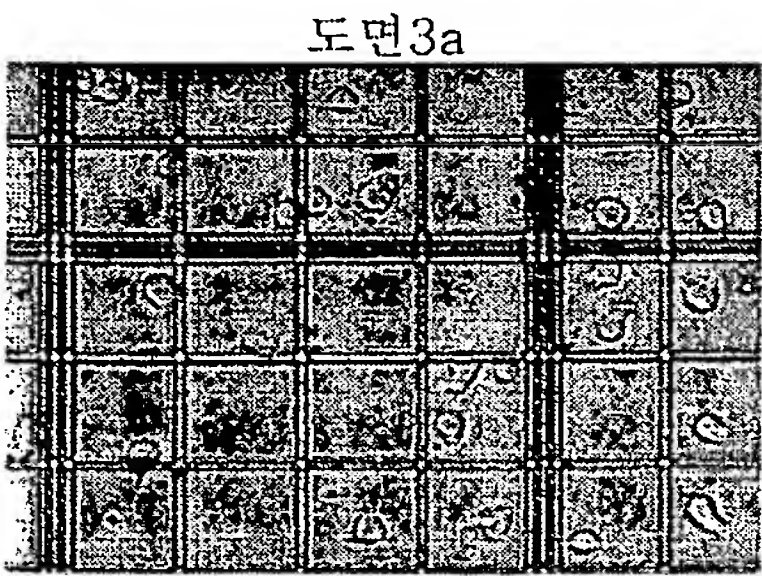
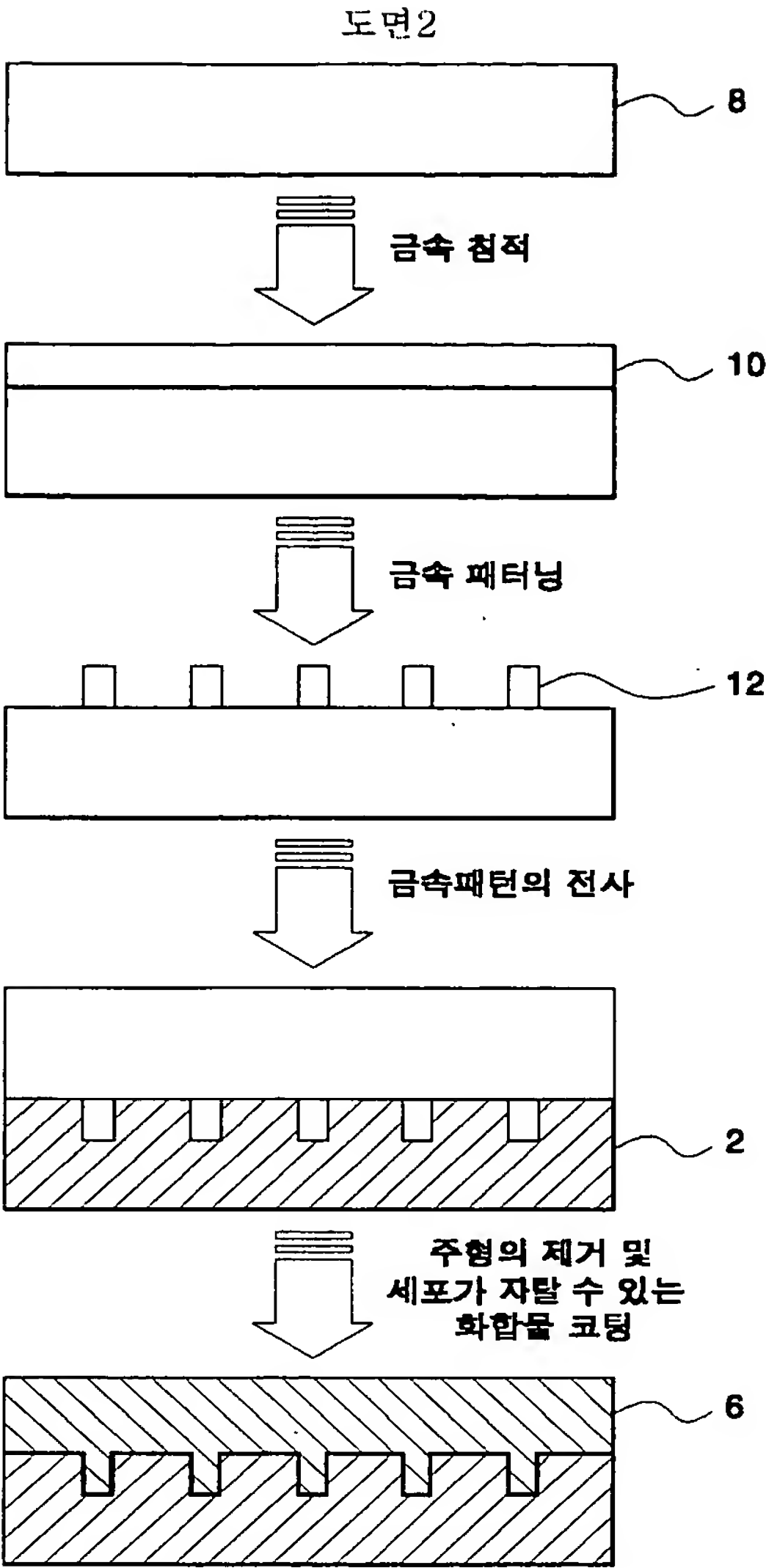
제7항에 있어서, 상기 금속 막 격자 패턴을 전사하기 이전의 배양용기 기판 또는 상기 격자 패턴이 전사된 배양용기 기판 상에 세포가 자랄 수 있도록 진공상의 기체 플라즈마를 이용하여 표면 변이를 유발하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 11.

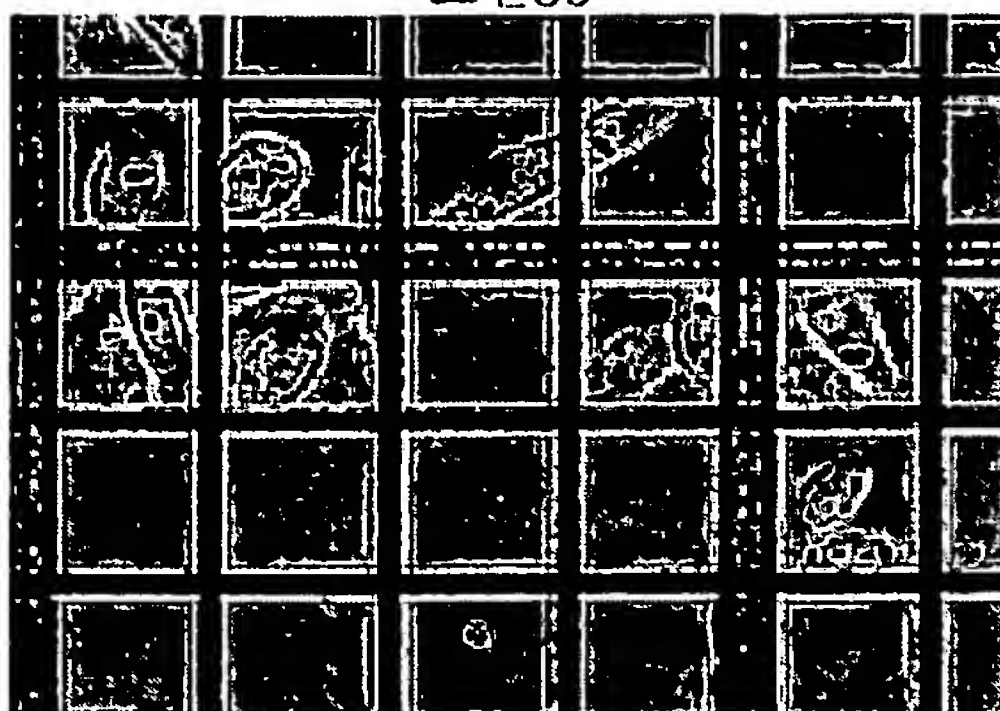
제7항에 있어서, 상기 금속은 구리, 백금, 금, 강철 또는 알루미늄인 방법.

도면

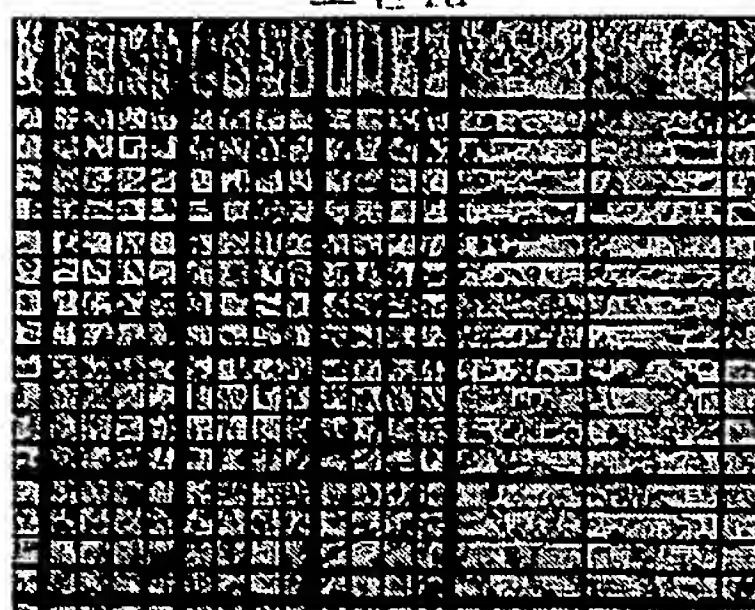




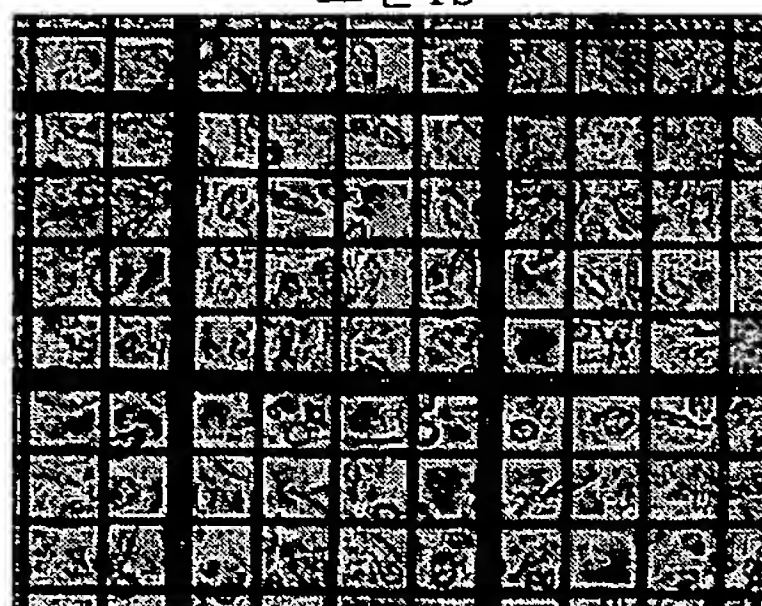
도면3b



도면4a



도면4b



도면4c

